

PCT/JP 2004/017480

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

06.12.2004

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日 2 0 0 3 年 1 1 月 2 7 日
Date of Application:

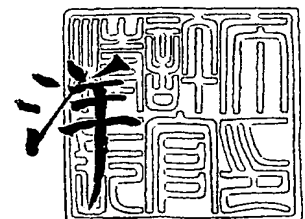
出 願 番 号 特 願 2 0 0 3 - 3 9 7 6 4 7
Application Number:
[ST. 10/C]: [J P 2 0 0 3 - 3 9 7 6 4 7]

出 願 人 株 式 会 社 ヒ ロ イ ン タ ー ナ シ ョ ナ ル
Applicant(s):

2 0 0 5 年 1 月 2 0 日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

小 川



BEST AVAILABLE COPY

出証番号 出証特 2 0 0 4 - 3 1 2 2 9 7 7

【書類名】 特許願
【整理番号】 14523701
【提出日】 平成15年11月27日
【あて先】 特許庁長官殿
【国際特許分類】 A61K 37/78
【発明者】
 【住所又は居所】 東京都八王子市南陽台 3 - 2 0 - 7
 【氏名】 指 田 豊
【発明者】
 【住所又は居所】 東京都八王子市緑町 8 9 9 - 1 2
 【氏名】 三 卷 祥 浩
【発明者】
 【住所又は居所】 東京都練馬区石神井町 7 - 2 7 - 1 9 センチュリー北原 2 0 3
 【氏名】 黒 田 明 平
【発明者】
 【住所又は居所】 東京都八王子市堀之内 5 9 4 コーポ萩生田 1 0 3
 【氏名】 小 林 亮 介
【発明者】
 【住所又は居所】 東京都町田市相原町 1 3 4 0
 【氏名】 神 藤 宏 昭
【発明者】
 【住所又は居所】 東京都町田市根岸町 1 7 5 - 6
 【氏名】 野 坂 浩 資
【発明者】
 【住所又は居所】 東京都世田谷区成城 4 - 1 0 - 1 6
 【氏名】 石 井 浩 泰
【特許出願人】
 【識別番号】 500094015
 【住所又は居所】 東京都町田市相原町 1 3 4 0
 【氏名又は名称】 株式会社 ヒロインターナショナル
【代理人】
 【識別番号】 100075812
 【弁理士】
 【氏名又は名称】 吉 武 賢 次
【選任した代理人】
 【識別番号】 100091487
 【弁理士】
 【氏名又は名称】 中 村 行 孝
【選任した代理人】
 【識別番号】 100094640
 【弁理士】
 【氏名又は名称】 紺 野 昭 男
【選任した代理人】
 【識別番号】 100107342
 【弁理士】
 【氏名又は名称】 横 田 修 孝
【選任した代理人】
 【識別番号】 100109841
 【弁理士】
 【氏名又は名称】 堅 田 健 史

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 087654

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 特許請求の範囲 1

【物件名】 明細書 1

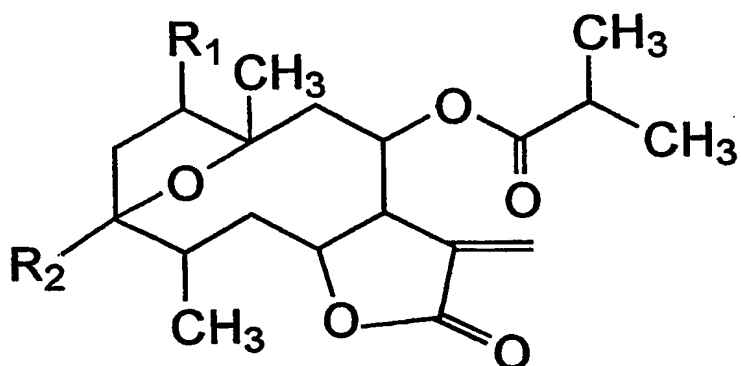
【物件名】 要約書 1

【書類名】 特許請求の範囲

【請求項 1】

下記一般式 (I) :

【化 1】



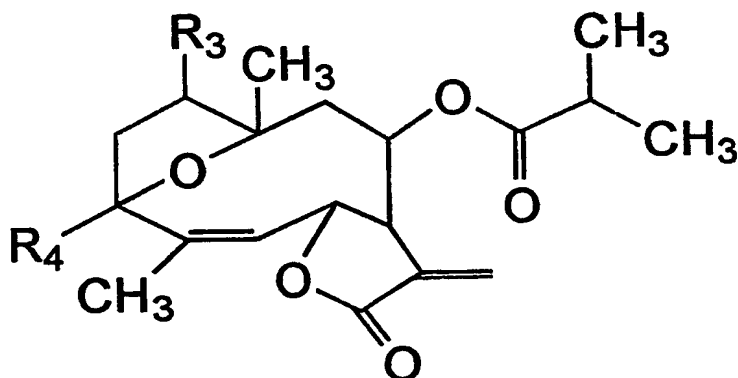
(I)

【上記式中、R₁ は水酸基を示し、R₂ はメトキシ基を示す】
で表される、化合物。

【請求項 2】

下記一般式 (II) :

【化 2】



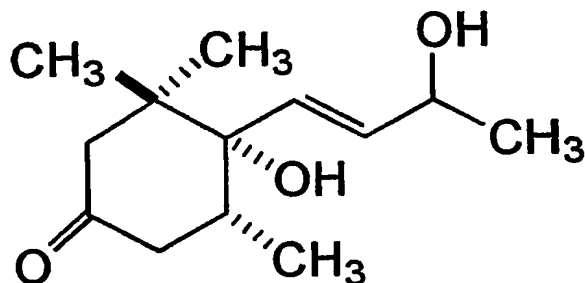
(II)

【上記式中、R₃ は水酸基を示し、R₄ はメトキシ基を示す】
で表される、化合物。

【請求項 3】

下記一般式 (III) :

【化 3】



(Ⅲ)

[上記式中、3-ヒドロキシ-1-プテニル基の3-ヒドロキシ基が3S立体配座とされてなるものである]

で表される、化合物。

【請求項 4】

請求項 1 または 2 に記載の化合物を有効成分とする、抗癌剤。

【請求項 5】

動物または人の癌治療に使用される、請求項 4 に記載の抗癌剤。

【請求項 6】

前記癌が白血病である、請求項 4 または 5 に記載の抗癌剤。

【請求項 7】

前記白血病が急性骨髄性白血病である、請求項 6 に記載の抗癌剤。

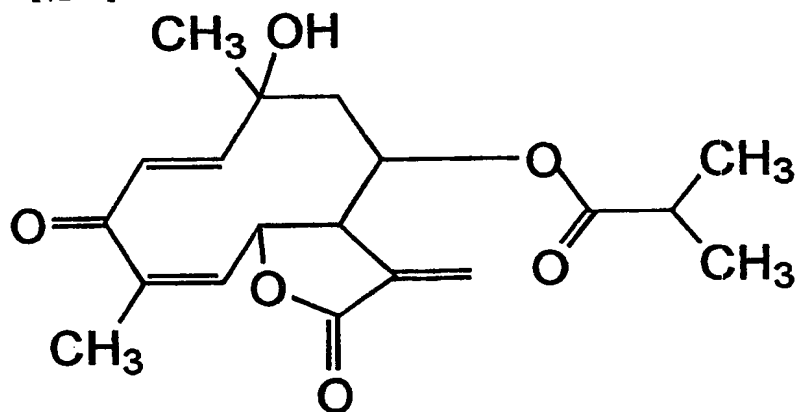
【請求項 8】

上記一般式 (I) において、 R_1 および R_2 が水酸基を示す化合物、 R_1 が水素原子を示し R_2 が水酸基を示す化合物、 R_1 が水素原子を示し R_2 がメトキシ基を示す化合物、

上記一般式 (II) において、 R_3 および R_4 がメトキシ基を示す化合物、 R_3 がメトキシ基を示し R_4 が水酸基を示す化合物、

下記の一般式 (IV) :

【化 4】

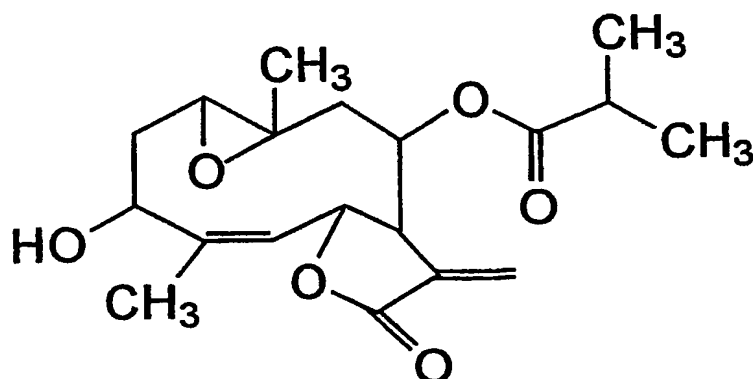


(IV)

で表される化合物、または

下記の一般式 (V) :

【化5】



(V)

で表される化合物の一種または二種以上の化合物を有効成分とする、抗急性骨髄性白血病剤。

【請求項 9】

動物または人の急性骨髄性白血病治療に使用される、請求項 8 に記載の抗急性骨髄性白血病剤。

【請求項 10】

請求項 1～3 および 8 に記載された化合物を含んでなる組成物を製造する方法であって、

請求項 1～3 および 8 に記載された化合物を含んでなる原料を用意し、

必要に応じて加熱下において、前記原料を溶媒で抽出し、

前記抽出物をイオン交換クロマトグラフィーに供給し、第 1 の低級アルコールと、第 2 の低級アルコールと、必要に応じて低級エステルとをこれらの順により溶媒抽出し、

前記第 2 の低級アルコール画分中に、請求項 1～3 および 8 に記載された化合物を含んでなる組成物を得ることを含んでなる、方法

【請求項 11】

前記原料がキク科植物またはアカバナ科チョウジタデ属植物である、請求項 10 に記載の方法。

【請求項 12】

請求項 1～3 および 8 に記載された化合物をそれぞれを得る方法であって、

請求項 1～3 および 8 に記載された化合物を含んでなる組成物を用意し、

前記組成物をクロマトグラフィーで分離することを複数回繰り返すことにより、請求項 1～3 および 8 に記載された化合物をそれぞれ得ることを含んでなる、方法。

【請求項 13】

前記組成物が請求項 10 または 11 に記載の方法で得られたものである、請求項 12 に記載の方法。

【請求項 14】

請求項 1～3 および 8 に記載された化合物を含んでなる組成物を第 1 の組成物と第 2 の組成物とに分離する方法であって、

請求項 1～3 および 8 に記載された化合物を含んでなる組成物を用意し、

前記組成物を順相クロマトグラフィー、次いで逆相クロマトグラフィーで分離し、第 1 の組成物と第 2 の組成物とに分離するものであり、

第 1 の組成物が請求項 1～3 に記載された化合物と、上記一般式 (I) において R₁ および R₂ が水酸基を示す化合物と、上記一般式 (IV) で表される化合物と、上記一般式 (V) で表される化合物とを含んでなるものであり、

第2の組成物が上記一般式(I)において、R₁が水素原子を示しR₂が水酸基を示す化合物と、R₁が水素原子を示しR₂がメトキシ基を示す化合物とを含んでなるものである、方法。

【請求項15】

前記組成物が請求項10または11に記載の方法で得られたものである、請求項14に記載の方法。

【請求項16】

請求項1～3に記載された化合物と、上記一般式(I)においてR₁およびR₂が水酸基を示す化合物と、上記一般式(IV)で表される化合物と、上記一般式(V)で表される化合物とをそれぞれ得る方法であって、

前記各化合物を含んでなる組成物を用意し、

前記組成物を順相クロマトグラフィー、逆相クロマトグラフィー、液体クロマトグラフィーまたはこれらを組合せたもので分離し、前記各化合物を単離することを含んでなる、方法。

【請求項17】

前記組成物が請求項14または15に記載の方法で得られた第1の組成物である、請求項16に記載の方法。

【請求項18】

上記一般式(I)において、R₁が水素原子を示しR₂が水酸基を示す化合物と、R₁が水素原子を示しR₂がメトキシ基を示す化合物とをそれぞれ得る方法であって、

前記各化合物を含んでなる組成物を用意し、

前記組成物を順相クロマトグラフィー、逆相クロマトグラフィー、またはこれらを組合せたもので分離し、前記各化合物を単離することを含んでなる、方法。

【請求項19】

前記組成物が請求項14または15に記載の方法で得られた第2の組成物である、請求項18に記載の方法。

【請求項20】

請求項12～19のいずれか一項に記載の方法で得られた、請求項1～3および8に記載された化合物。

【書類名】明細書

【発明の名称】新規化合物および医薬組成物

【技術分野】

【0001】

本発明は、新規化合物、特に、キク科植物またはアカバナ科ショウジタデ属植物から抽出単離された新規化合物およびその用途に関する。また、本発明はキク科植物またはアカバナ科ショウジタデ属植物から抽出単離された既知物質の医薬用途に関する。

【背景技術】

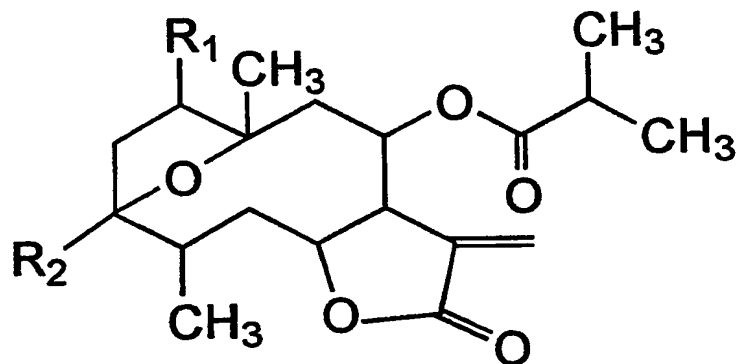
【0002】

キク科植物またはアカバナ科ショウジタデ属植物、特に、ニトベギクは、皮膚病（水虫病）、肝炎、黄疸、膀胱炎の抑制する等の薬理効果を有するものとして知られている。例えば、特許第2609780号公報（特許文献1）および特願平8-127538号公報（特許文献2）によれば、ニトベギクを煎じたものまたはその抽出エキスをを用いた糖尿病治療薬が提案されている。

【0003】

また、ニトベギク抽出物から単離された化合物と同一の化合物が文献に開示されている。例えば、Raghwendra Pal, et al. Indian Journal of Chemistry, Section B: Organic Chemical Including Medicinal Chemistry, 14B, 259 - 262 (1976)（非特許文献1）、Raghwendra Pal, et al. Indian Journal of Chemistry, Section B: Organic Chemical Including Medicinal Chemistry, 15B, 208 - 211 (1977)（非特許文献2）、Schuster A, et al. Phytochemistry, 31, 3139 - 3141 (1992)（非特許文献3）には、これらの文献順に、下記の一般式（I）で表される化合物：

【化1】



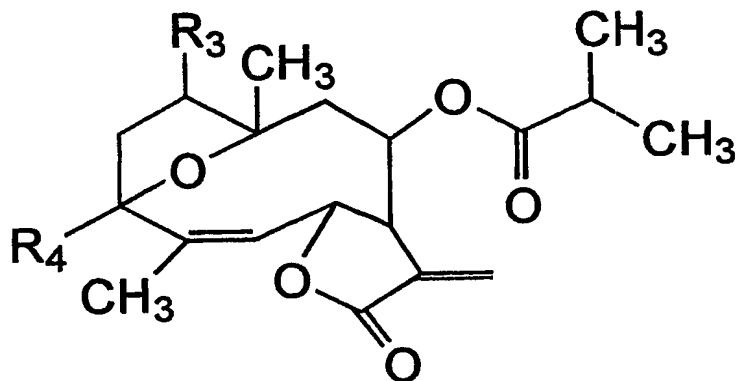
(I)

において、R₁ および R₂ が水酸基を示す化合物（以下、「TD-7」という）、R₁ が水素原子を示し R₂ が水酸基を示す化合物（以下、「TD-9」という）、R₁ が水素原子を示し R₂ がメトキシ基を示す化合物（以下、「TD-10」という）が開示されている。

【0004】

Paulo Sergio Pereira, et al. Phytochemistry, 45, 1445-1448 (1997)（非特許文献4）、C. Zdero et al. Phytochemistry, 26, 1999 - 2006 (1987)（非特許文献5）には、下記の一般式（II）で表される化合物：

【化2】



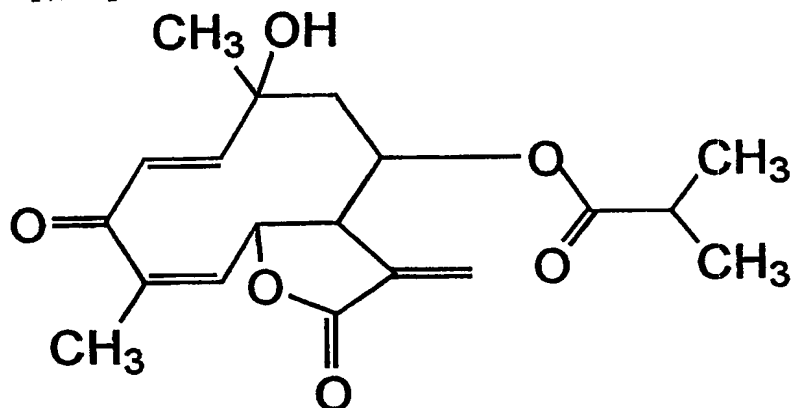
(II)

において、R₃ および R₄ がメトキシ基を示す化合物（以下、「TD-1」という）、R₃ がメトキシ基を示し R₄ が水酸基を示す化合物（以下、「TD-4」という）が開示されている。

【0005】

Baruah Nabin C., et al. Journal of Organic Chemistry, 44, 1831 - 1835 (1979) (非特許文献6) には、下記の一般式 (IV) :

【化3】

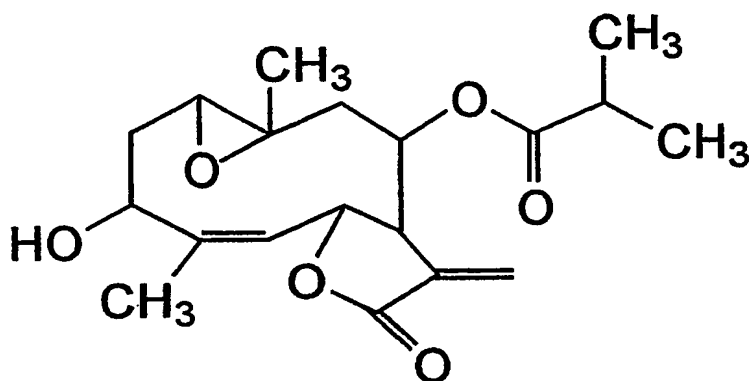


(IV)

で表される化合物（以下、「TD-2」という）が開示されている。

Baruah Nabin C., et al. Journal of Organic Chemistry, 44, 1831 - 1835 (1979) (非特許文献7) には、下記の一般式 (V) :

【化4】



(V)

で表される化合物（以下、「TD-8」という）が開示されている。

Antonia G. Gonzalez, et al, Journal of Natural Products, 57, 400 - 402 (1994) (非特許文献8)では、(4S, 5R) - 4-hydroxy-4-[(1E, 3R) - 3-hydroxy-1-butenyl] - 3, 3, 5-trimethyl-cyclohexanone)が開示されている。

【0006】

一方、Raghwendra Pal., et al. Journal of Pharmaceutical Science, 65, 918 - 920 (1976) (非特許文献9)では、ニトベギクの抽出液からタギチニン(Tagitinin) A~Fが単離されたとの報告、およびこれら化合物中で、タギチニンFのみがP388マウス白血病を腹腔内移植したマウスに対して延命効果を与えたとの報告がなされている。ここで、タギチニンAはTD-7に、タギチニンCはTD-2に、タギチニンDはTD-9に、タギチニンEはTD-8にそれぞれ相当するものであるが、タギチニンFは本願発明におけるTD-1~10に相当するものではない。

【0007】

しかしながら、キク科植物またはアカバナ科チョウジタデ属植物中には未知化合物が存在しており、これら化合物の同定が切望されている。また、これら植物から抽出単離された既知、未知の化合物の新たな用途（薬理効果等）についても解明することが急務とされている。

【特許文献1】特許2609780号公報

【特許文献2】特願平8-127538号公報

【非特許文献1】Raghwendra Pal, et al. Indian Journal of Chemistry, Section B: Organic Chemical Including Medicinal Chemistry, 14B, 259 - 262 (1976)。

【非特許文献2】Raghwendra Pal, et al. Indian Journal of Chemistry, Section B: Organic Chemical Including Medicinal Chemistry, 15B, 208 - 211 (1977)。

【非特許文献3】Schuster A, et al. Phytochemistry, 31, 3139 - 3141 (1992)。

【非特許文献4】Paulo Sergio Pereira, et al. Phytochemistry, 45, 1445 - 1448 (1997)。

【非特許文献5】C. Zdero et al. Phytochemistry, 26, 1999 - 2006 (1987)。

【非特許文献6】Raghwendra Pal, et al. Indian Journal of Chemistry, Section B: Organic Chemical Including Medicinal Chemistry, 15B, 208 - 211 (1977)。

【非特許文献7】Baruah Nabin C, et al. Journal of Organic Chemistry, 44, 1831 - 1835 (1979)。

【非特許文献8】Antonia G. Gonzalez, et al, Journal of Natural Products, 57, 400 - 402 (1994)

【非特許文献 9】 Raghwendra Pal, et al. Journal of Phamaceutical Science, 65, 918 - 920 (1976)。

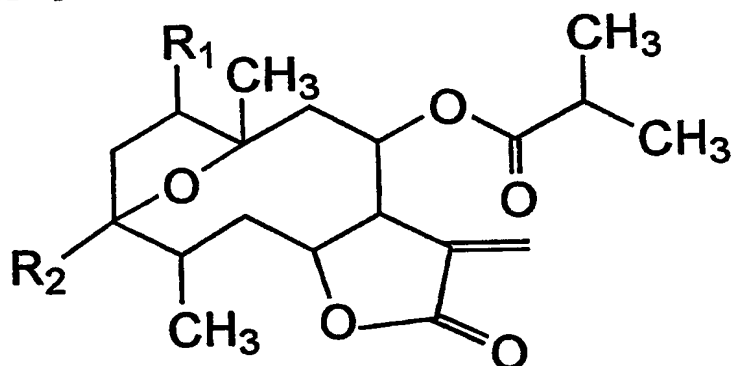
【発明の概要】

【0008】

本発明者等は、今般、抗癌作用を有する新規化合物と、既知化合物が白血病対して抗癌作用を有することを見出した。本発明はかかる知見によるものである。従って、本発明は、新規化合物と、特定の癌に対して抗癌性を有する既知化合物の医薬用途を提供するものである。よって、本発明の第一の態様によれば、新規化合物を提供でき、その化合物は下記の一般式で表されるものである。

下記の一般式 (I) :

【化 5】

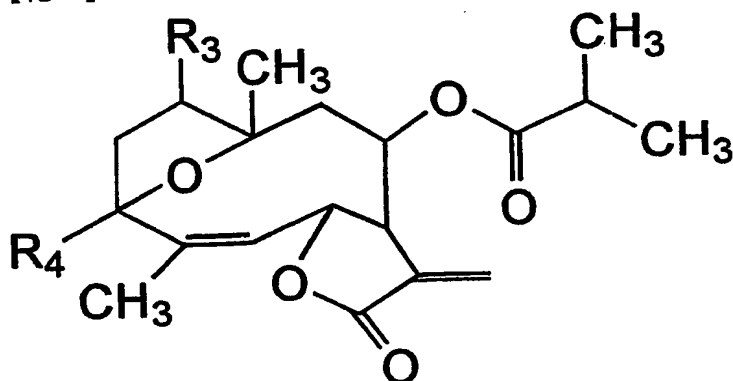


(I)

[上記式中、R₁ は水酸基を示し、R₂ はメトキシ基を示す]
で表される化合物。

下記の一般式 (II) :

【化 6】

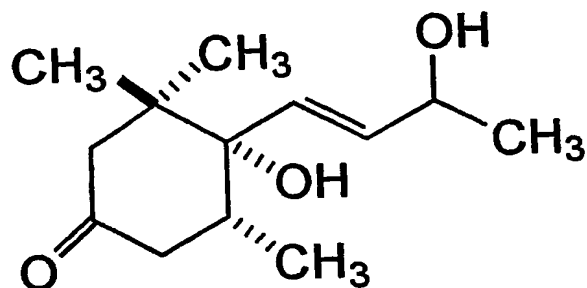


(II)

[上記式中、R₃ は水酸基を示し、R₄ はメトキシ基を示す]
で表される化合物。

下記の一般式 (III) :

【化7】



(III)

[上記式中、3-ヒドロキシ-1-ブテニル基の3-ヒドロキシ基が3S立体配座とされてなるものである]
で表される、化合物。

【0009】

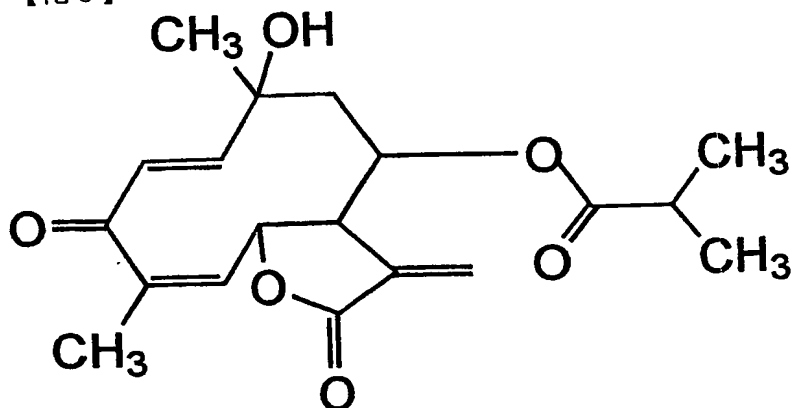
本発明の第二の態様によれば、既知である下記の一般式で表される化合物の一種または二種以上を含んでなる抗急性骨髄性白血病剤を提供することができる。

上記した一般式(I)において、 R_1 および R_2 が水酸基を示す化合物(TD-7)、 R_1 が水素原子を示し R_2 が水酸基を示す化合物(TD-9)、 R_1 が水素原子を示し R_2 がメトキシ基を示す化合物(TD-10)、

上記した一般式(II)において、 R_3 および R_4 がメトキシ基を示す化合物(TD-1)、 R_3 がメトキシ基を示し R_4 が水酸基を示す化合物(TD-4)、

下記の一般式(IV)：

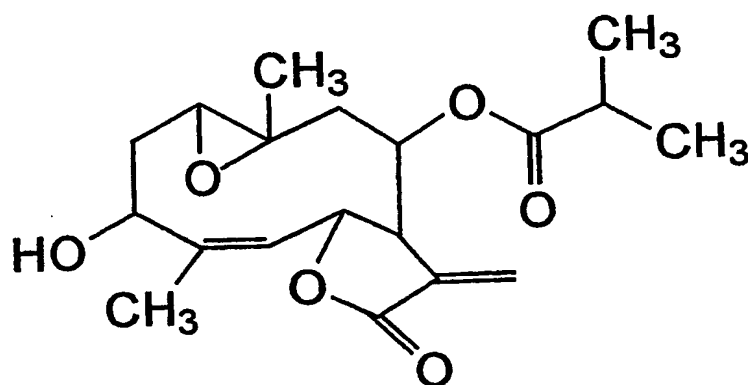
【化8】



(IV)

で表される化合物(TD-2)、および
下記の一般式(V)：

【化9】



(V)

で表される化合物 (TD-8)。

【発明の具体的説明】

【0010】

本発明の第一の態様

本発明の第一の態様で提供する新規化合物は、上記一般式 (I) において、式中、R₁ が水酸基を示し R₂ がメトキシ基を示す化合物 (以下、「TD-3」という)、上記一般式 (II) において、式中、R₃ が水酸基を示し R₄ がメトキシ基を示す化合物 (以下、「TD-6」という)、上記一般式 (III) で表される化合物 (以下、「TD-5」という) である。

TD-5 は、非特許文献 8 に記載された化合物と立体配座が異なる異性体化合物であり、具体的には、3-ヒドロキシ-1-プテニル基のヒドロキシ基が 3S 立体配座とされる新規化合物である。

【0011】

新規化合物の用途

本発明による新規化合物 TD-3、TD-5 および TD-6 は、免疫力の向上、新陳代謝機能の活性化、病原菌に対する滅殺および殺菌作用、過剰な炎症またはアレルギーの抑制効果、生活習慣病 (糖尿病等)、免疫疾患の抑制および治療等を付与する有効成分としての用途が考えられる。これら新規化合物の中でも、「TD-3」および「TD-6」は抗癌性が認められ、好ましくは白血病 (より好ましくは急性骨髄性白血病) に抗癌性が認められる。従って、新規化合物の「TD-3」および「TD-6」は抗癌剤の有効成分とされ、この抗癌剤は癌治療に使用することができる。

【0012】

新規化合物の「TD-3」および「TD-6」の化合物を癌療用の抗癌剤として使用するには、種々の投与形態に合わせて、これらの新規化合物を公知の医薬品用担体と組合せて製剤化することが可能である。例えば、皮下注射、静脈内注射、筋肉内注射、座薬などによる非経口投与、または錠剤、カプセル剤、散剤、顆粒剤などによる経口投与の全身投与のほか、軟膏剤、ローション剤、座薬、エアゾール剤などの局所投与の形態を例示することができる。

投与量は、動物および人の年齢、体重、症状に合わせて適宜定めることができる。

【0013】

本発明の第二の態様

本発明の第二の態様によれば、既知化合物の一種または二種以上を含んでなる抗急性骨髄性白血病剤を提供することができる。先に説明した通り、「TD-1」、「TD-2」、「TD-4」、「TD-7」、「TD-8」、「TD-9」、「TD-10」は既知化

合物である。これらの既知化合物は、動物または人（好ましい）の急性骨髄性白血病に対して優れた抑制および治療効果があることが今回の実験結果により明らかになったものである。従って、これらTD化合物はこれらを有効成分として含む抗急性骨髄性白血病剤として利用することができる。医薬品としての薬剤および投与形態等は本発明の第一の態様で説明したのと同様であってよい。

【0014】

TD化合物の製造方法

1) TD-1~10を含んでなる組成物の製造方法（抽出）

本発明の第三の態様によれば、TD-1~10を含んでなる組成物を得る方法を提案することができる。その方法は、TD-1~10を含んでなる原料を用意し、

必要に応じて加熱下において、前記原料を溶媒で抽出し、

前記抽出物をイオン交換クロマトグラフィーに供給し、第1の低級アルコールと、第2の低級アルコールと、必要に応じて低級エステルとをこれらの順により溶媒抽出し、

前記第2の低級アルコール画分中に、TD-1~10を含んでなる組成物を得ることを含んでなるものである。

【0015】

原料

原料は、TD-1~10を有意量含んでなるものであればいずれのものであってもよいが、好ましくはキク科植物またはアカバナ科チョウジタデ属植物が挙げられる。

キク科植物の好ましい具体例としてはニトベギク〔（ティソニア・ディベルシフォリア（ヘムスル）エー、グレイ：「*Tithonia diversifolia* (Hems l) A, Gray」、（同族としてティソニア・フラティコサ・キャンバイ・アンド・ローズ：「*Tithonia fruticosa* Canby & Rose」）、（ティソニア・スカベリマ・ベンス：「*Tithonia scaberrima* Benth」）、（ティソニア・ロンゲラディアタ（バートル）ブレイク：「*Tithonia longerradiata* (Bertol) Blake」）〕等の約10種類のもの、また、メキシコヒマワリ〔学名はティソニア・ロタンディフォリア（ミル）ブレイク：「*Tithonia rotundifolia* (Mill) Blake」〕が挙げられる。

アカバナ科チョウジタデ属の植物の好ましい具体例としては、キダチキンバイ〔（ラドウィギア・オクトバルビス・ラーベン：「*Ludwigia octovalvis* Raven」）、チョウジタデ（ラドウィギア・プロストラータ・ロックス：「*Ludwigia prostrata* Roxb」）〕が挙げられる。

【0016】

抽出手法

TD-1~10を含んでなる原料を抽出する際に使用する溶媒の具体例としては、炭素数1~5の低級アルコール、好ましくはエタノールを使用する。

また、第1の低級アルコールと、第2の低級アルコールとは同一または異なるものであってもよいが好ましくは別のものがよい。第1の低級アルコールと第2の低級アルコールとは炭素数1~6、好ましくは1~3のものを挙げることができる。本発明にあつては、第1の低級アルコールがメタノールであり、第2の低級アルコールがエタノールである組合せが好ましくは挙げられる。本発明の好ましい態様によれば、このイオン交換クロマトグラフィーの抽出を迅速に行うために、第二の低級アルコールをカラム内に入れた後に、低級エステルを抽出溶媒として用いることが好ましい。溶媒抽出において、加熱してもよく、その加熱温度は-20℃以上100℃以下、好ましくは上限が80℃以下であり、下限が1℃以上である。

使用するイオン交換クロマトグラフィーはカラムにイオン交換物質（好ましくは多孔質イオン交換樹脂：例えば、三菱化学株式会社製「ダイヤイオンHP-20」）を充填したものが挙げられる。

溶媒抽出後、この溶媒を蒸発し濃縮させて抽出物としてTD-1~10の化合物を含んでなる組成物とすることが好ましい。

【0017】

2) TD-1~10の単離

本発明の第四の態様によれば、TD-1~10の化合物を単離する方法を提案することができ、その方法は、TD-1~10を含んでなる組成物を用意し、前記組成物をクロマトグラフィーで分離することを複数回繰り返すことにより、TD-1~10の化合物を得るものである。

【0018】

本発明の好ましい態様によれば、TD-1~10を含んでなる組成物は先に説明したTD-1~10を含んでなる組成物の製造方法で得たものを利用することが好ましい。分離溶媒は、水、アセトン、クロロホルム、炭素数5以下の低級アルコール、炭素数5以下の低級エステル、およびこれらの混合溶媒を使用することができる。使用するクロマトグラフィーは順相、逆相のものであってよく、充填剤として多孔質物質（好ましくはシリカゲル）を使用してよい。さらに、（高速）液体クロマトグラフィーを使用することができる。本発明にあっては、これらクロマトグラフィーの組合せによって、TD化合物を単離することが好ましい。

【0019】

本発明に第四の態様の一例は、下記の第五および第六の態様が挙げられる。従って、カラム充填剤、クロマトグラフィー、抽出溶媒等は先のTD化合物の単離方法で説明したのと同様であってよい。

TD-1~10を含む組成物の分画

本発明による第五の態様によれば、TD-1~10を含む組成物からTD-1~8を含む組成物と、TD-9および10を含む組成物のそれぞれに分離する方法を提供することができ、その方法は、TD-1~10を含んでなる組成物を順相カラムクロマトグラフィー、次いで逆相カラムクロマトグラフィーで分離し、TD-1~8の化合物を含む組成物と、TD-9および10を含む組成物の二種に分離するものである。

【0020】

本発明による第六の態様によれば、TD-1~8を含む組成物と、TD-9および10を含む組成物から、TD-1~10をそれぞれを単離する方法が提供される。具体的には以下の通りである。

1) TD-1、2、4および5の単離

TD-1~8を含む組成物を順相または逆相の（シリカゲル）カラムクロマトグラフィーを繰り返し行い、さらに（高速）液体クロマトグラフィーを行うことで、TD-1、TD-2、TD-4、TD-5をそれぞれ単離することができる。

本発明のより好ましい態様によれば、TD-1~10を含んでなる組成物を逆相シリカゲルカラムクロマトグラフィー、逆相シリカゲルカラムクロマトグラフィー、逆相シリカゲルカラムクロマトグラフィーにより、順次分離精製することにより、TD-1、TD-2、TD-4、TD-5をそれぞれ単離することができる。

【0021】

2) TD-3および7の単離

TD-1~8を含んでなる組成物を順相または逆相のシリカゲルカラムクロマトグラフィーを繰り返し行い、TD-3および7をそれぞれ単離することができる。

本発明のより好ましい態様によれば、TD-1~8を含んでなる組成物を順相シリカゲルカラムクロマトグラフィー、逆相シリカゲルカラムクロマトグラフィー、逆相シリカゲルカラムクロマトグラフィーにより、順次分離精製することにより、TD-3およびTD-7をそれぞれ単離することができる。

【0022】

3) TD-6および8の単離

TD-1~8を含んでなる組成物を順相または逆相のシリカゲルカラムクロマトグラフィーを繰り返し行い、TD-6および8をそれぞれ単離することができる。

本発明のより好ましい態様によれば、TD-1~8を含んでなる組成物を順相シリカゲル

ルカラムクロマトグラフィー、逆相シリカゲルカラムクロマトグラフィー、逆相シリカゲルカラムクロマトグラフィーにより、順次分離精製することにより、TD-6およびTD-8をそれぞれ単離することができる。

【0023】

4) TD-9および10の単離

TD-9および10を含んでなる組成物を順相または逆相のシリカゲルカラムクロマトグラフィーを繰り返し行い、TD-9および10をそれぞれ単離することができる。

本発明のより好ましい態様によれば、TD-9および10を含んでなる組成物を順相シリカゲルカラムクロマトグラフィー、順相シリカゲルカラムクロマトグラフィー、逆相シリカゲルカラムクロマトグラフィーにより順次精製することにより、TD-9およびTD-10をそれぞれ単離することができる。

【0024】

実施例

TD-1～10の化合物の抽出および分画

ニトベギク（ティソニア・ディベルシフォリア（ヘムスル）エー、グレイ）の地上部分を乾燥した粉末3.0kgを80%エタノール45リットルで65℃、2時間加熱抽出後、濾過し不純物を取り除いた後に溶媒を除去し濃縮エキスとした。

この濃縮エキス（320g）をイオン交換カラムクロマトグラフィー（イオン交換剤：ダイヤイオンHP-20）に充填した。次に、第1のアルコール溶媒（メタノール：水の比率が50%以上）を流し、次に、第2のアルコール溶媒（80%エタノール）45リットルを流し、最後に低級エステルである酢酸エチルを流して、65℃、2時間加温抽出し、第2のアルコール画分を得た。この第2のアルコール画分を濾過し不純物を除去した後、第2のアルコール溶媒を蒸発させて濃縮した抽出物を得た。

次に、この抽出物（320g）を順相シリカゲルカラムクロマトグラフィー（クロロホルムとメタノールの比率が9：1の溶媒）、次いで逆相シリカゲルカラムクロマトグラフィー（充填剤：ODSシリカゲル、メタノールと水の比率が1：1の溶媒）に付し、2-1画分（TD-1～8を含有）、2-2画分、2-3画分（TD-9および10を含有）、2-4画分のそれぞれを得た。順相シリカゲルカラムクロマトグラフィーにおいては固定相であるシリカゲルへの吸着力の差により、逆相ODSシリカゲルカラムクロマトグラフィーにおいては、オクタデシル基でシリカゲル表面を置換したものを充填剤として使用し、それにより固定相（ODSシリカゲル）と移動相（溶媒）への分配作用を利用して、上記4つの画分を分離した。

2-1画分と、2-3画分のそれぞれについて下記の処理を行い、各TD化合物を単離した。

【0025】

2-1画分／TD-1、2、4および5の単離

2-1画分の一部を順相シリカゲルカラムクロマトグラフィー（クロロホルムとアセトンとの比率が9：1、49：1の溶媒）、逆相シリカゲルカラムクロマトグラフィー（アセトニトリルと水との比率が2：3の溶媒）、逆相シリカゲルカラムクロマトグラフィー（メタノールと水との比率が11：9の溶媒）、逆相シリカゲルカラムを装着した高速液体クロマトグラフィー（HPLC）（メタノールと水との比率が7：3、3：2の溶媒）により、順次精製することにより、TD-1（28.0mg）、TD-2（14.0mg）、TD-4（35.3mg）、TD-5（13.0mg）を単離した。

【0026】

2-1画分／TD-3および7の単離

2-1画分の一部を順相シリカゲルカラムクロマトグラフィー（クロロホルムとアセトンとの比率が49：1の溶媒）、逆相シリカゲルカラムクロマトグラフィー（メタノールと水との比率が11：9の溶媒）、逆相シリカゲルカラムクロマトグラフィー（アセトニトリルと水との比率が1：2の溶媒）により順次精製することにより、TD-3（56.2mg）およびTD-7（50.0mg）を単離した。

【0027】

2-1画分/TD-6および8の単離

2-1画分の一部を順相シリカゲルカラムクロマトグラフィー（クロロホルムとアセトンの比率が49:1、19:1の溶媒）、逆相シリカゲルカラムクロマトグラフィー（メタノールと水との比率が3:2の溶媒）、逆相シリカゲルカラムクロマトグラフィー（アセトニトリルと水との比率が1:2の溶媒）により順次精製することにより、TD-6（14.0mg）およびTD-8（8.7mg）を単離した。

【0028】

2-3画分/TD-9および10の単離

2-3画分を順相シリカゲルカラムクロマトグラフィー（クロロホルムとアセトンとの比率が19:1、4:1、2:1の溶媒）、順相シリカゲルカラムクロマトグラフィー（ヘキサンとアセトンとの比率が9:1、7:3の溶媒）、逆相シリカゲルカラムクロマトグラフィー（アセトニトリルと水との比率が9:1、4:1、3:1、2:1、1:1の溶媒）により順次精製することにより、TD-9（8.4mg）およびTD-10（7.8mg）を単離した。

【0029】

TD-1~10の構造決定

上記で得られたTD-1~10の構造を決定した。

(1) 新規化合物の構造決定

新規化合物であるTD-3、TD-5およびTD-6は下記のスペクトルデータ等により構造を決定した。

TD-3 (C₂₀H₃₀O₇)

(1S, 3R, 4S, 6R, 7S, 8R, 10R) -1-hydroxy-3-methoxy-3, 10-epoxy-8-isobutyryloxygermacra-11(13)-en-6, 12-olide

1) 性状: 白色粉末 $[\alpha]_D^{26}$ -102度 (メタノール)

2) HR-ESI-MS m/z: 383.2058 (Calcd for C₂₀H₃₀O₇, 383.2070)

3) UV (メタノール) λ_{max} (log ϵ): 216 (log ϵ = 3.81)

4) IR (film) cm⁻¹: 3446, 2972, 2933, 1761, 1736, 1460, 1317, 1261, 1194, 1155, 1072, 1007, 984.

5) ¹H-NMR (重クロロホルム) ppm: 6.19 (1H, d, J=3.4 Hz, H-13a), 5.54 (1H, ddd, J=11.4, 5.3, 2.6 Hz, H-8), 5.47 (1H, d, J=2.9 Hz, H-13b), 4.46 (1H, ddd, J=10.6, 6.9, 1.1 Hz, H-6), 4.06 (1H, dd, J=9.5, 8.6 Hz, H-1), 3.92 (1H, m, H-7), 3.10 (3H, s, OMe), 2.49 (1H, dd, J=14.5, 9.5 Hz, H-2b), 2.37 (1H, m, H-2'), 2.06 (1H, m, H-5b), 1.99 (1H, m, H-4), 1.97 (1H, dd, J=14.5, 5.4 Hz, H-9a), 1.81 (1H, dd, J=14.5, 8.6 Hz, H-2a), 1.72 (1H, br d, J=13.3 Hz, H-5a), 1.63 (1H, dd, J=14.5, 11.4 Hz, H-9b), 1.37 (3H, s, Me-14), 1.01 and 0.99 (each 3H, d, J=7.0 Hz, Me-3' and Me-4'), 0.99 (3H, d, J=7.0 Hz, Me-15).

6) ¹³C-NMR (重クロロホルム) ppm: 79.7 (C-1), 41.7 (C-2), 108.8 (C-3), 46.4 (C-4), 38.2 (C-5), 82.3 (C-6), 48.2 (C-7), 70.2 (C-8), 35.1 (C-9), 81.3 (C-10), 13.7 (C-11), 169.8 (C-12), 121.7 (C-13), 24.1 (C-14), 18.3 (C-15), 176.7 (C-1'), 34.5 (C-2'), 19.1 (C-3' or C-4'), 19.6 (C-3' and C-4'), 49.2 (OMe).

【0030】

TD-5 (C₁₃H₂₂O₃)

(4S, 5R) -4-hydroxy-4-[(1E, 3S) -3-hydroxy-1-butenyl] -3, 3, 5-trimethyl-cyclohexanone

1) 性状: 白色粉末 $[\alpha]_D^{26}$ -8度 (メタノール)

2) HR-ESI-MS m/z: 227.1050 (Calcd for C₁₃H₂₂O₃, 227.1647)

3) IR (film) cm⁻¹: 3415, 2968, 11900, 2877, 1695, 1454, 1412, 1369, 1286, 114

0, 1061, 1030, 977, 939.

4) $^1\text{H-NMR}$ (重クロロホルム) ppm: 2.77 (1H, d, $J=13.6$ Hz, H-2ax), 1.84 (1H, dd, $J=13.6$, 2.2 Hz, H-2ax), 2.35 (1H, t-like, $J=12.9$ Hz, H-4ax), 2.13 (1H, ddd, $J=13.6$, 4.5, 2.2 Hz, H-4eq), 2.19 (1H, ddq, $J=12.9$, 6.5, 4.5 Hz, H-5), 5.63 (1H, dd, $J=15.8$, 0.8 Hz, H-7), 5.77 (1H, dd, $J=15.8$, 5.7 Hz, H-8), 4.36 (1H, ddd, $J=6.4$, 5.7, 0.8 Hz, H-9), 1.25 (3H, d, $J=6.4$ Hz, Me-10), 0.87 (3H, s, Me-11), 0.90 (3H, s, Me-12), 0.81 (3H, d, $J=6.5$ Hz, Me-13).

5) $^{13}\text{C-NMR}$ (重クロロホルム) ppm: 42.5 (C-1), 51.4 (C-2), 211.4 (C-3), 45.1 (C-4), 36.4 (C-5), 77.0 (C-6), 131.8 (C-7), 135.2 (C-8), 68.3 (C-9), 23.9 (C-10), 24.5 (C-11), 24.4 (C-12), 15.9 (C-13).

【0031】

TD-6 (C₂₀H₂₈O₇)

(1S, 3R, 6R, 7R, 8R, 10R) -1-hydroxy-3-methoxy-3, 10-epoxy-8-isobutyryloxygermacra-4, 11(13)-dien-6, 12-olide

1) 性状: 白色粉末 $[\alpha]_D^{26}$ -110度 (メタノール)

2) HR-ESI-MS m/z : 381.1947 (Calcd for C₂₀H₂₈O₇, 381.1913)

3) UV (メタノール) λ_{\max} (log ϵ): 213 (log $\epsilon = 3.88$)

4) IR (film) cm^{-1} : 3421, 2972, 1763, 1732, 1587, 1282, 1186, 1111, 1064, 991

5) $^1\text{H-NMR}$ (重クロロホルム) ppm: 6.20 (1H, d, $J=2.8$ Hz, H-13a), 5.66 (1H, m, H-5), 5.59 (1H, ddd, $J=11.2$, 5.0, 4.6 Hz, H-8), 5.55 (1H, d, $J=2.3$ Hz, H-13b), 5.20 (1H, m, H-6), 4.16 (1H, m, H-7), 3.77 (1H, dd, $J=11.1$, 3.9 Hz, H-1), 3.11 (3H, s, OMe), 2.91 (1H, br d, $J=11.3$ Hz, H-2b), 2.34 (1H, m, H-2'), 2.31 (1H, m, H-2a), 1.82 (1H, dd, $J=14.1$, 5.0 Hz, H-9a), 1.70 (3H, t-like, $J=1.8$ Hz, Me-15), 1.66 (1H, dd, $J=14.1$, 11.2 Hz, H-9b), 1.44 (3H, s, Me-14), 1.00 (3H, d, $J=7.1$ Hz, Me-3' or Me-4'), 0.97 (3H, d, $J=7.2$ Hz, Me-3' or Me-4').

6) $^{13}\text{C-NMR}$ (重クロロホルム) ppm: 77.1 (C-1), 45.2 (C-2), 109.7 (C-3), 138.4 (C-4), 131.2 (C-5), 75.8 (C-6), 49.6 (C-7), 71.2 (C-8), 39.7 (C-9), 87.5 (C-10), 136.2 (C-11), 169.5 (C-12), 122.7 (C-13), 20.8 (C-14), 21.6 (C-15), 175.9 (C-1'), 334.0 (C-2'), 18.6 (C-3' or C-4'), 19.0 (C-3' or C-4'), 50.1 (OMe).

【0032】

(2) 既知化合物の構造決定

TD-1、TD-2、TD-4、TD-7、TD-8、TD-9、TD-10は既知化合物であり、各種スペクトルデータを上記した非特許文献1~7の記載内容に基づいてこれらの構造を決定した。具体的には下記の通りであった。

TD-1

(1R, 3R, 6R, 7R, 8R, 10R) -1, 3-dimethoxy-3, 10-epoxy-8-isobutyryloxygermacra-4, 11(13)-dien-6, 12-olide

TD-2

(6S, 7R, 8R, 10R) -10-hydroxy-3-oxo-8-isobutyryloxygermacra-1, 4, 11(13)-trien-6, 12-olide

TD-4

(1R, 3R, 6R, 7R, 8R, 10R) -3-hydroxy-1-methoxy-3, 10-epoxy-8-isobutyryloxygermacra-4, 11(13)-dien-6, 12-olide

TD-7

(1S, 3R, 4S, 6R, 7S, 8R, 10R) -1, 3-dihydroxy-3, 10-epoxy-8-isobutyryloxygermacra-11(13)

-en-6, 12-olide

TD-8

(1R, 3S, 6S, 7R, 8R, 10R) - 3-hydroxy-1, 10-epoxy-8-isobutyrylgermacra-4, 11(13)-dien-6, 12-olide

TD-9

(3R, 4S, 6R, 7S, 8R, 10S) - 3-hydroxy-3, 10-epoxy-8-isobutyryloxygermacra-11(13)-en-6, 12-olide

TD-10

(3R, 4S, 6R, 7S, 8R, 10S) - 3-methoxy-3, 10-epoxy-8-isobutyryloxygermacra-11(13)-en-6, 12-olide

TD-1~10の評価試験

TD-1~10の抗癌作用を、ヒト急性骨髄性白血病細胞株HL-60を用いた細胞毒性活性の数値により検討した。具体的には下記の通りに試験した。

FBS含有RPMI 1640培地中で前培養したHL-60細胞数を1mL中 4×10^4 個となるようにFBS含有RPMI 1640培地に懸濁させ、懸濁液を96-wellマイクロプレートの各wellに196μLずつ分注し、37℃、5%炭酸ガス中、24時間プレインキュベートした。続いて、コントロールとしてEtOH-H₂O (1:1)、サンプルとして各TD化合物をEtOH-H₂O (1:1)に溶解したものを各々4mLずつ各wellに添加した。37℃、5%炭酸ガス中、72時間インキュベートした後、MTT試薬を10mLずつ各wellに添加し、さらに4時間インキュベートした。培地を除去した後、生成したMTTホルマゼンを175mL DMSOに溶解させ、マイクロプレートリーダーを用いて、吸光波長550nmで検出して、コントロールに対する細胞数を算出した。IC₅₀値は用量-作用曲線から算出した。

TD-1~10のIC₅₀値 (μg/mL) は下記の表1の通りであった。

【0033】

表1

化合物	IC ₅₀ 値 (μg/mL)
TD-1	(0.60)
TD-2	(0.38)
TD-3	(4.97)
TD-6	(2.50)
TD-7	(3.87)
TD-8	(0.92)
TD-9	(2.50)
TD-10	(2.85)

【書類名】 要約書

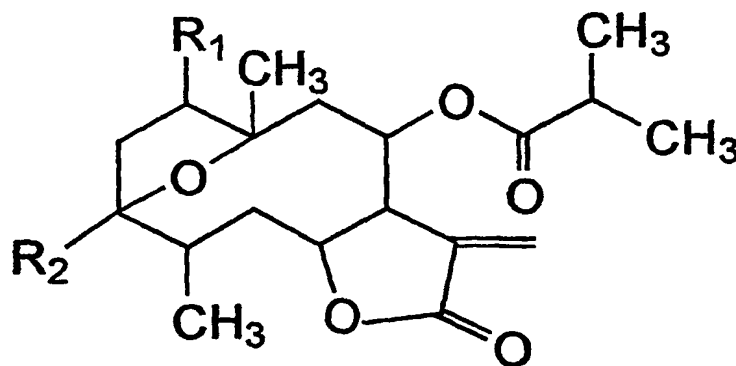
【要約】

【課題】 キク科植物から抽出単離された新規化合物を提案する。

【解決手段】 下記の一般式 (I)：

[上記式中、R₁ は水酸基を示し、R₂ はメトキシ基を示す]
で表される、化合物。

【化 1】



(I)

【選択図】 なし

特願 2 0 0 3 - 3 9 7 6 4 7

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[5 0 0 0 9 4 0 1 5]

1. 変更年月日

2 0 0 0 年 3 月 2 日

[変更理由]

新規登録

住 所

東京都町田市相原町 1 3 4 0

氏 名

株式会社 ヒロインターナショナル

Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/JP04/017480

International filing date: 25 November 2004 (25.11.2004)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: JP
Number: 2003-397647
Filing date: 27 November 2003 (27.11.2003)

Date of receipt at the International Bureau: 04 February 2005 (04.02.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record.**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

☒ **BLACK BORDERS**

☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**

☐ **FADED TEXT OR DRAWING**

☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**

☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**

☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**

☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**

☒ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**

☒ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**

☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.